

# BAB I

## PENDAHULUAN

Penyakit demam dengue dan demam berdarah dengue (DBD) merupakan masalah utama kesehatan dunia. Sekitar 2,5 milyar manusia tinggal di zona tropis dan subtropis, sangat rentan terserang infeksi dengue (WHO 2007a: 1). Infeksi dengue disebabkan oleh 4 serotipe virus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4), yang ditransmisikan dari satu penderita ke penderita lainnya melalui nyamuk *Aedes aegypti* (L.) (Gubler 1997: 1). Virus dengue memiliki genom RNA *positive sense* yang terdiri atas 3 gen pengkode protein struktural serta 7 gen pengkode protein nonstruktural (Alcon *dkk.* 2002: 376). Infeksi dengue dapat menyebabkan manifestasi klinis dari gejala demam dengue yang relatif ringan sampai gejala *hemorrhagic* yang mampu menyebabkan kematian (Young *dkk.* 2000: 1053).

World Health Organization (WHO) melaporkan bahwa setiap tahun terjadi sekitar 50--100 juta kasus infeksi virus dengue di seluruh dunia, 25.000 kasus di antaranya merupakan kasus kematian (Kumarasamy *dkk.* 2007: 75). Sebagian besar kasus infeksi virus dengue terjadi di daerah Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Jumlah kasus infeksi dengue yang terjadi di Indonesia terbesar di zona Asia Tenggara sejak tahun 2004 sampai sekarang. Lebih dari 100.000 kasus infeksi dengue dilaporkan di Indonesia selama periode Januari--November 2007, dengan *case fatality rate* (CFR) sebesar 1% (WHO 2007b: 1).

Menurut Lemes *dkk.* (2005: 305), jumlah kematian akibat infeksi virus dengue dapat dikurangi melalui penanganan dan deteksi dini gejala penyakit. Deteksi awal gejala penyakit sangat penting untuk menghindari kesalahan diagnosis serta mencegah penyakit berkembang ke tahap yang lebih berbahaya dan mematikan (Deen *dkk.* 2006: 170). Salah satu penyebab tingginya tingkat kematian akibat infeksi virus dengue di Indonesia adalah keterlambatan dan kesalahan penanganan penderita oleh para tenaga medis. Menurut Kuno *dkk.* (1998: 757), kit diagnostik merupakan solusi yang tepat untuk mendeteksi gejala infeksi dengue secara dini dan mengurangi jumlah kematian. Permasalahannya belum tersedia alat diagnostik dengue buatan lokal yang mampu mendeteksi infeksi secara cepat, akurat, dan spesifik.

Usaha penanggulangan jumlah kematian akibat infeksi dengue di Indonesia dengan mengembangkan kit diagnostik dengue lokal sedang dilakukan oleh Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan, Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM), Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT). Kit diagnostik dengue tersebut dikembangkan menggunakan bahan dasar protein rekombinan nonstruktural-1 (NS1) virus dengue.

Protein NS1 dikode oleh gen *NS1*, protein tersebut berpotensi sebagai bahan dasar pengembangan alat diagnostik dengue (Lemes *dkk.* 2005: 306). Protein NS1 merupakan glikoprotein *highly conserved* yang berperan penting dalam replikasi dan maturasi virus (Kumarasamy *dkk.* 2007: 75). Menurut Young *dkk.* (2000: 1053), antigen NS1 potensial karena memiliki imunogenisitas tinggi, mampu menginduksi antibodi melalui aktivitas

pengikatan sistem komplemen, serta berada dalam konsentrasi tinggi selama fase klinis awal pada serum pasien yang mengalami infeksi primer maupun sekunder (Alcon *dkk.* 2002: 376). Berdasarkan karakteristik protein NS1 tersebut, kit diagnostik dengue yang sedang dikembangkan diharapkan mampu mendeteksi keberadaan antibodi anti-NS1 pada serum penderita fase awal infeksi. Penderita dapat segera diberikan penanganan yang tepat sebelum terjadi tahap infeksi lebih lanjut sehingga jumlah kasus kematian akibat infeksi dengue dapat diminimalisir.

Kloning gen *NS1* dalam sel bakteri *Escherichia coli* merupakan tahap awal dari proyek jangka panjang pengembangan kit diagnostik dengue. Klona rekombinan hasil kloning diharapkan dapat mengekspresikan protein rekombinan NS1 dengan optimal sehingga dapat digunakan sebagai bahan dasar kit diagnostik yang spesifik.

Damayanti (2007: 61) telah berhasil melakukan kloning gen *NS1* virus dengue (berukuran 1.050 pb) pada vektor ekspresi pET-21d(+) dalam *E. coli strain* DH5 $\alpha$ . Akan tetapi, ekspresi protein rekombinan pET-*NS1* dalam *E. coli strain* BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) masih kurang optimal dan spesifik (Haritsyah 2008: 73). Oleh karenanya, dilakukan penelitian kloning menggunakan fragmen gen *NS1* (1.160 pb) yang mengandung *signal sequence* alami dari C-terminal gen *E* (78 pb) dan N-terminal gen *NS2a* (21 pb). *Signal sequence* tersebut diduga berperan dalam proses translokasi protein NS1 ke retikulum endoplasma dan membran sel pada tahap infeksi sehingga ekspresi gen *NS1* pada penelitian diharapkan dapat optimal seperti ekspresi *in vivo* (Costa *dkk.*

2007: 414). Kloning dilakukan pada vektor ekspresi pGEX-6P1 dan sel inang bakteri *E. coli strain* BL21 Star™(DE3). Penggunaan vektor dan sel inang yang dirancang untuk memaksimalkan ekspresi protein asing diharapkan dapat mengoptimalkan ekspresi gen *NS1* dengue.

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah produk PCR yang diamplifikasi dari cDNA virus dengue serotipe 3 (DEN-3) *strain* CH53489. Virus dengue tersebut diisolasi dari serum pasien asal Indonesia yang positif terinfeksi dengue oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Berdasarkan penelitian Corwin *dkk.* (2001 *lihat* Sukri *dkk.* 2003: 529), disimpulkan bahwa DEN-3 merupakan serotipe utama dalam sejumlah kejadian wabah infeksi dengue di Indonesia.

Gen *NS1* (1.160 pb) diamplifikasi dengan teknik PCR, kemudian diligasikan secara *in vitro* pada vektor ekspresi plasmid pGEX-6P1. Plasmid rekombinan hasil ligasi ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 Star™(DE3). Koloni transforman yang tumbuh pada medium ampisilin diverifikasi untuk memastikan keberadaan gen *NS1* pada kandidat plasmid rekombinan pGEX-nk*NS1*. Hasil *sequencing* dianalisis dan disejajarkan dengan basis data DNA virus dengue pada GenBank.

Penelitian bertujuan menghasilkan klon gen *NS1* virus dengue pada vektor ekspresi pGEX-6P1 dalam sel inang *Escherichia coli* BL21 Star™(DE3). Klon rekombinan kemudian akan diinduksi ekspresinya sehingga menghasilkan protein *NS1*. Protein *NS1* tersebut selanjutnya diuji imunologi dengan *western blot*.